

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002706

International filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-087499
Filing date: 24 March 2004 (24.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 7 4 9 9

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

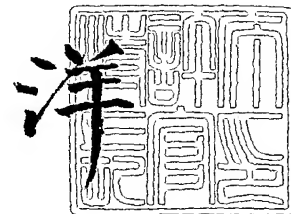
J P 2 0 0 4 - 0 8 7 4 9 9

出 願 人
Applicant(s): 三井化学株式会社

2 0 0 5 年 4 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P0003127
【提出日】	平成16年 3月24日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12P 19/04 A61K 7/00
【発明者】	
【住所又は居所】	山口県玖珂郡和木町和木 6 - 1 - 2 三井化学株式会社内
【氏名】	加藤 嘉博
【発明者】	
【住所又は居所】	山口県玖珂郡和木町和木 6 - 1 - 2 三井化学株式会社内
【氏名】	松原 浩一
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
【氏名】	多葉田 誉
【特許出願人】	
【識別番号】	000005887
【氏名又は名称】	三井化学株式会社
【代表者】	中西 宏幸
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	005278
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ニゲラ属植物の細胞を培養することによって得られる培養物又は培養液から分離、回収されるペクチンであって、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ であり、且つピークを示す分子量が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の範囲であるペクチン。

【請求項 2】

ニゲラ属植物がクロタネソウ (*Nigella damascena*) であることを特徴とする請求項 1 記載のペクチン。

【請求項 3】

ニゲラ属植物がニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*) であることを特徴とする請求項 1 記載のペクチン。

【請求項 4】

主要な構成糖としてガラクトツロン酸を 70～90 モル% 含む請求項 1～3 の何れか一項に記載のペクチン。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載のペクチンの保湿剤としての使用。

【請求項 6】

ニゲラ属植物の細胞を培養することによって得られる培養物又は培養液から請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のペクチンを分離、回収して得ることを特徴とする、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ であり、且つピークを示す分子量が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の範囲にあるペクチンの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ニゲラ属植物細胞由来ペクチン

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニゲラ属植物の細胞培養物から得られるペクチンとそれを含有する化粧料に関するものである。更に詳しくは、保湿剤として使用される高分子量のペクチンに関するものである。

【背景技術】

【0002】

多くの植物の各器官にはペクチン質と呼ばれる多糖類が含まれ、分裂組織や柔組織に多く存在している。ペクチン質とは植物体内または植物体から得られるコロイド状炭水化物で、ガラクトuron酸基を多く含み、それが鎖状結合している一群の物質である。その存在形態は植物の細胞壁成分としてセルロース、ヘミセルロース、リグニン、タンパク質、無機質などと結合し、水に不溶のプロトペクチンと呼ばれる形である。ペクチン質の中で水溶性であり、適当な条件で糖及び酸とゲル化する物質がペクチンと呼ばれる。

【0003】

ペクチンの一般的な製造は(1)植物出発物質からの高温酸性下での抽出、(2)液体抽出物の精製、及び(3)液体からの抽出ペクチンの単離の工程からなる。その中で、酸抽出段階では、植物材料を硝酸、硫酸、塩化水素酸または他の無機もしくは有機酸のような希釈酸を用い、通常、pH1~2、温度80℃~100℃の条件で処理する。一般に用いられる植物出発材料は、ジュースの製造で得られる柑橘類の果皮並びにリンゴジュースおよびリンゴ酒製造で得られるリンゴの絞りかすが使用されているが、それらの植物出発材料から得られるペクチンの分子量は $6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ にしかすぎない。

【0004】

植物細胞を液体培地中で培養することによって、ペクチンが得られることは知られている。Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 2618-2622 (1988年)には、ダイズ培養細胞から分子量 1.8×10^4 のペクチンが液体中に放出されることが報告されているが、その生産量は13.4mg/lと僅かである。また、上記の柑橘類などの木本性植物は細胞壁中のフェノール性物質の含量が高く、硬い組織であるため組織培養が困難であり、ペクチンの生産には適していない。そのため、培養によってペクチンを多量に生産できる植物は知られていない。

【0005】

WO9636693号公報には、多くの植物細胞にDNAメチル化阻害剤で刺激を与えて、ペクチン断片が得られることが開示されている。しかし、同公報には、得られるペクチンの分子量や生産量については何ら開示されていない。

【0006】

ペクチンはエステル化度、分子量の違いにより、さまざまな特性を有しており、ゲル化剤、増粘剤、安定剤などとして、大部分は食品分野で利用されている。エステル化の程度を示すエステル化度(DE)は、全ガラクトuron酸(全カルボキシル基)中に占めるエステル化されたガラクトuron酸(カルボキシル基)の割合を示す数値(%)であり、メチルエステル化度の高低により、高メトキシルペクチン(HMペクチン)と低メトキシルペクチン(LMペクチン)に分類される。通常、DEが50%より高いものをHMペクチン、50%以下のものをLMペクチンと呼ばれている。一般に、前記した、植物出発物質からの高温酸性条件下で抽出されるペクチンの多くはHMペクチンであり、LMペクチンを得るためには更に酸、アルカリ、酵素あるいはアンモニアを用いて脱メチル化する必要がある。柑橘類の果皮からのペクチン抽出に際して、抽出時の高温酸性条件や脱メチル化処理によってエステルの加水分解と共に糖鎖が切断され、分子量が低下する欠点があった。その結果、高分子量のペクチンにはさまざまな特性を有していることが期待されるが、そのようなペクチンを安定的に製造する方法は知られていなかった。

【0007】

ペクチンを化粧品の一成分として使用することは既に知られている。化粧品に利用されるペクチンは専ら分子量が $6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ のペクチンであり、それらはゲル化剤、増粘剤、安定剤として、有効化粧成分の補助剤として添加されているのみであり、ペクチン保湿剤の有効成分として利用することは知られていない。

【非特許文献1】Y. Hayashi, K. Yoshida, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 2618-2622 (1988年)

【特許文献1】WO9636693号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上述のとおり従来の植物組織から抽出して得られる市販ペクチンの分子量は $6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ である。発明が解決しようとする課題は更に分子量の高いペクチンの特性を見出し、分子量が高いペクチンを多量に供給できる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するべく本発明者らは、従来のペクチンに対して更に分子量の高いペクチンを得るために、種々の植物が産出するペクチンを調べ、且つ該ペクチンを大量に製造する方法を鋭意検討した結果、ニゲラ属植物を原料植物としてカルスを誘導し、更に細胞を培養することによって、従来の市販ペクチンに対して、更に高分子量のペクチンが得られること、大量に製造できることを見出した。そして、得られた更に高分子量のペクチンは水分保持能が優れ、保湿剤として利用できることを見出した。これら知見に基づき本発明を完成した。即ち、本発明は以下のとおりである。

【0010】

[1] ニゲラ属植物の細胞を培養することによって得られる培養物又は培養液から分離、回収されるペクチンであって、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ であり、且つピークを示す分子量が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の範囲であるペクチン。

[2] ニゲラ属植物がクロタネソウ (*Nigella damascena*) であることを特徴とする

[1] 記載のペクチン。

[3] ニゲラ属植物がニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*) であることを特徴とする [1] 記載のペクチン。

[4] 主要な構成糖としてガラクトツロン酸を70～90モル%含む請求項1～3の何れか一項に記載のペクチン。

[5] [1] から [4] のいずれか1項に記載のペクチンの保湿剤としての使用。

[6] ニゲラ属植物の細胞を培養することによって得られる培養物又は培養液から [1] から [4] のいずれか1項に記載のペクチンを分離、回収して得ることを特徴とする、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ であり、且つピークを示す分子量が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の範囲にあるペクチンの製造方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明のニゲラ属植物細胞由来のペクチンは従来の方法で得られる市販ペクチンに対して、更に分子量が高い。そのため、本発明のペクチンは水分保持能に優れる。また、ゲル強度にも優れ、且つ粘性は低い。本発明のペクチンを化粧料素材として使用した場合、良好な使用感を発揮し、化粧料の保湿剤として最適である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明のペクチンはニゲラ属植物の細胞を培養することによって得られる培養物又は培養液から分離、回収して得られるペクチンである。

【0013】

ニゲラ属植物はキンポウゲ科に属し、地中海、西アジア、北アフリカを原産地として約

20種が存在する。種としてはクロタネソウ (*Nigella damascena*)、ニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*)、ニゲラ・ヒスパニカ (*Nigella hispanica*)、ニゲラ・アーベニス (*Nigella arvensis*) が代表的である。本発明ではニゲラ属に属する植物の、いずれの植物を使用しても良いが、クロタネソウ (*Nigella damascena*)、ニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*) を使用することが好ましい。

【0014】

本発明のペクチンは、カルス（脱分化細胞）を誘導し、更に、得られたカルスを増殖させる2段階の培養で製造することができる。

【0015】

先ず、カルスを誘導する培養では、ニゲラ属植物の種子、葉、茎、根等の組織を30～95%エタノール、0.01～0.1%塩化ベンザルコニウム、0.1～5%次亜塩素酸ナトリウムなどによってその植物体の表面を殺菌して、カルスを誘導し、培養する。カルスを誘導する培地はムラシゲ・スクーグ、リンスマイヤー・スクーグ、ホワイト、ニッチ、ガンボーグ、WPM (Woody Plant Medium) 等の、植物組織培養に一般的に用いられる培地成分に炭素源及び植物ホルモンを添加して、121℃、15分間の条件で蒸気加熱滅菌して使用する。炭素源はグルコース、フルクトース等の単糖又はそれらを構成糖とするショ糖、マルトース等の二糖類やオリゴ糖を0.1～10%の範囲で添加して使用するが、中でもショ糖を0.5～5%の範囲で用いることが好ましい。植物ホルモンとしてはオーキシン類、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、ブラシノステロイドなどを $0 \sim 10^{-4}$ Mの濃度範囲で単独、又は組み合わせて使用する。オーキシン類としてインドール酢酸、インドール酪酸、 α -ナフタレン酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,6-ジクロロ安息香酸、また、サイトカイニンの例としてゼアチン、フルフリルアミノプリン（カイネチン）、ベンジルアデニン、イソペンテニルアデニン、ジメチルアミノプリンなどが挙げられる。ジベレリンは活性型であるGA₁、GA₃、GA₄、GA₇が好ましく、ブラシノステロイドはブラシノリドが好ましい。カルスの誘導に使用する培地に加える成分の内、加熱によって分解する物質は、それ以外の成分を蒸気加熱滅菌した後に別途、0.2 μ mのフィルターを使用した濾過滅菌をして添加する。培地のpHは調製時に水酸化ナトリウムや水酸化カリウムなどの希アルカリ溶液によってpH5～7、好ましくは5.5～6とする。

【0016】

カルス誘導は固体培地でも、液体培地でも可能であるが、通常、前記培地を0.4～2%寒天や0.1～0.5%ゲルライトなどによって固化した固体培地上で培養するのが好ましい。培養は15～30℃、好ましくは23～27℃の温度で培養し、その際、明所でも暗所でもどちら条件下で培養してもよい。通常、培養5～60日後に、1～30mm径の細胞塊としてカルスを得ることができる。

【0017】

次に、カルスを新しい培地に移植して培養することによってカルスを増殖させる。本培養は固体培養、液体培養のどちらでも良いが、経済性、大量生産性を考えて液体培養で行うのが好ましい。培養はカルスを誘導する際の培地と同じか、又は塩濃度を減ずるなどの改変を加えた培地で培養を行う。塩濃度を減ずる改変を加えた培地とは培地成分中の硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム等の主要無機塩のうち1種又は2種以上の成分をペクチンの生産に影響を及ぼさない程度に減じた培地である。また、培地中に公知の添加剤として知られるカザミノ酸などの有機酸、アミノ酸などの窒素源、ココナッツミルク、酵母エキス、ポリペプトンを0.01～10g/lの濃度で加えることもできる。

【0018】

カルスを増殖させる培養の培養温度、光条件、培養期間はカルス誘導時の培養条件と同様の条件で、培養を2～5回繰り返すことによって数細胞から数百の細胞によって作られる細胞塊として培養細胞が得られる。更に継続的に培養細胞を増殖させることによって、ペクチンを培養物又は培養液中にコロイド状態又は可溶化した状態で生産させることがで

きる。大量にペクチンを製造するためには液体培養が好ましく、その培養方式は5～30日毎に培養物及び培養液を全量回収する回分培養、5～30日毎に一部の培養物及び培養液を回収し、新鮮培地を添加して培養する半回分培養、培養物及び培養液の回収と新鮮培地の添加を一定の割合で常に行う連続培養のいずれの方式でも良い。初期の細胞密度は1～300g/lの範囲で培養が可能であるが、高密度化によって短期間で高濃度のペクチンを生産することもできる。液体培養時の酸素供給は往復及び旋回振とうや、培養液への直接通気またはフォローファイバーを用いた間接的な方法のいずれの方法でも可能である。ペクチン生産量を向上させるためには、酸素供給量を増大することが有効であり、例えば旋回振とう培養では振とう数を100回転/分以上、200回転/分以下とすることやフラスコ容器あたりの培地量を容量の5%以上、30%以下として気液界面を増大することが好ましく、培養液へ直接通気する場合では培養液あたりの通気量が毎分5容積%以上、20容積%以下とすることが好適である。酸素供給量の増大は細胞の増殖速度を早めることに対しても有効である。

【0019】

かくして得られた培養物又は培養液中にペクチンはコロイド状態又は可溶化した状態で存在する。

【0020】

培養物又は培養液中からペクチンを回収するには、コロイド状態又は可溶化した状態のペクチンを先ず可溶化させる。可溶化にあたって、ペクチン濃度が3g/l以下となるように該培養物及び培養液に水、キレート剤、酸性緩衝剤、炭酸塩のような希薄アルカリ溶液を加えて、0～40℃、好ましくは15～35℃の温和な温度条件でペクチンを可溶化する。キレート剤としてはシュウ酸、シュウ酸アンモニウム、重合リン酸塩（ヘキサメタリン酸ナトリウム又は食品添加物のカルゴン）、エチレンジアミン四酢酸またはその塩類などが挙げられる。酸性緩衝剤としてはリン酸、クエン酸などを用いることができ、炭酸塩としては炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどが挙げられる。

【0021】

ペクチンを可溶化した後、ペクチンを含む溶液から細胞などの固形物を濾過や遠心分離により除去する。その後、0.5～5倍容量、好ましくは1～3倍容量のエタノール、アセトンなどの有機溶媒を加えてペクチンを沈殿させて回収する。回収した沈殿物を再び水に溶解することによってペクチンを任意の濃度に濃縮することができる。また、必要に応じて、適当な分子量の分画が可能な透析膜及び限外濾過膜を用いて低分子成分を除くことによって、任意の分子量を有するペクチンが得られる。濃縮されたペクチン溶液は凍結乾燥によって白色又は微黄色粉末としてペクチンを得ることができる。

【0022】

かくして得られたペクチンは分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ にあり、且つ、ピークを示す分子量が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のペクチンである。更に好ましくは、分子量の範囲が $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ にあり、且つピークを示す分子量が $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ のペクチンである。本発明で言うペクチンの分子量とはゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した分子量を意味する。分子量の範囲とは、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定したペクチンの分子量分布の下限値と上限値を意味する。また、ピークを示す分子量とは、ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定したペクチンの分子量分布において、最も頻度が高い点の分子量を意味する。

【0023】

ペクチンの分子量はゲル濾過クロマトグラフィーの測定の結果、得られるペクチンの分布曲線と分子量が既知である標準物質のゲル濾過クロマトグラフィーの測定の結果、得られる分布曲線を比較して、決定する。本発明で言うペクチンの分子量を測定するゲル濾過クロマトグラフィーは以下の条件で測定する。

カラム : 東ソー製TSK gel PWシリーズ
移動相 : 0.1M硝酸ナトリウム水溶液
流速 : 0.5ml/分

温度 : 40℃
試料濃度 : 1 g / 1 濃度の水溶液
試料注入量 : 10 μ l
検出器 : 示差屈折計

尚、示差屈折計とは移動相との屈折率差によって物質を検出する検出器であって、島津製作所製 RID-10A などが挙げられる。

【0024】

本条件でペクチンのゲル濾過クロマトグラフィーを測定すると、保持時間軸に対してある特有の分布曲線が得られる。次に、分子量が既知の標準物質を同条件で測定して、保持時間軸に対して、標準物質特有の分布曲線が得られる。標準物質として、ポリエチレングリコール（分子量 2×10^6 、和光純薬試薬）、ポリエチレンオキシド（分子量 1×10^6 、 5×10^5 、 2×10^5 、 5×10^4 、ジーエルサイエンス試薬）、プルラン（分子量 1.6×10^6 、 8×10^5 、 4×10^5 、 2×10^5 、昭和電工試薬）がある。標準物質の分布曲線において、ピークを示す位置の保持時間を既知の分子量の保持時間とする。上記標準物質を単独で、または組み合わせて、少なくとも3種類の標準物質を適宜選択し、同様にゲル濾過クロマトグラフィーを測定して、各々の分子量に対応する保持時間を決定する。保持時間と分子量との関係から検量線を作成し、その後、ペクチンのゲル濾過クロマトグラフィー測定で得られた保持時間から、該ペクチンの分子量を決定する。分子量が 2×10^6 以上、または 5×10^4 以下のペクチンは、上記の検量線を外挿、または内挿して、該ペクチンの分子量を決定する。

【0025】

ペクチン中の構成糖の内、炭素鎖末端のヒドロキシメチル基がカルボキシル基に酸化されたウロン酸は公知のカルバゾール硫酸法によって比色定量（530 nm 吸収）することができる。本発明のペクチンは70～96モル%のウロン酸を含有する。本発明で得られたペクチンの構成糖の組成は塩酸、硫酸、酢酸またはトリフルオロ酢酸によって50～100℃の条件下に30分間～6時間、酸加水分解した後に遊離する中性糖とウロン酸を高速液体クロマトグラフィーで定量することによって調べることができる。本発明のペクチンはラムノース、マンノース、アラビノース、ガラクトース、キシロース、グルコース、フルクトース、ガラクトツロン酸、グルクロン酸などで構成され、主な成分のモル比はガラクトツロン酸：アラビノース：ガラクトース：グルクロン酸：グルコース：キシロース＝7～9：0.4～0.7：0.4～0.6：0.1～0.6：0.05～0.5：0.04～0.4である。すなわち、本発明のペクチンは主要な構成糖としてガラクトツロン酸を70～90モル%含有するペクチンである。

【0026】

ペクチンのエステル化度はけん化されたカルボキシル基を定量する方法で調べることができる。本発明ペクチンのエステル化度は0～60%であった。

【0027】

本発明のペクチンは従来得られている市販ペクチンと比較して、更に高分子量のペクチンである。本発明のペクチンの更なる特徴は、従来の市販のペクチンに対して、高い水分保持能を有するペクチンである。また、従来の市販のペクチンが有する性質、すなわち、水溶性であり、カルシウムイオンなどの2価以上の金属塩や糖及び酸と接触してゲル化する性質を有するペクチンである。

【0028】

本発明のペクチンは従来の市販のペクチンと比べて、分子量が高く、水分保持能が高い特徴を有している。そのため、保湿剤の有効成分として、化粧品に使用することができる。ここで言う保湿剤とは皮膚から水分蒸発を防ぎ、皮膚表面の水分調節及びしっとり感を与えるために主に化粧品に配合される物質である。公知のペーパーディスク法による水分保持試験や皮表角層水分測定装置による生体角層水負荷試験において、本発明のペクチンはいずれの試験においても、一般的に保湿剤として使用されているヒアルロン酸ナトリウムより高い水分保持能を示している。本発明のペクチンは特に、初期の水分保持能に優れ

ているため、皮膚浸透性や皮膚への親和性に優れている。また、本発明のペクチンはヒアルロン酸ナトリウムと同程度の高分子量であるにも関わらず、ヒアルロン酸ナトリウムよりも粘度が低い。そのため、使用者にしっとり感や滑らか感を与え、且つベタつき感が少ない使用感を与える。本発明のペクチンは、しっとり感や滑らか感が優れた化粧料用の素材として、化粧水、乳液、クリーム、パック、エッセンスなどに使用できる。

【0029】

また、本発明のペクチンは上記の保湿剤としての利用の他に、例えば、食品分野ではジャムやマーマレードの粘物質、飲料の安定化剤、プリンやクリームのゲル化剤などに、また、医薬品分野でも従来の市販のペクチンと同様に使用することができる。

【実施例】

【0030】

以下、本発明について実施例などを用いて更に詳しく説明するが、本発明はこれらにより制限を受けるものではない。

【0031】

[実施例1]

クロタネソウ (*Nigella damascena*) の幼苗を70%エタノールにより表面を殺菌し、続いて次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1%)で15分間処理した後、滅菌水により3回洗浄した。滅菌水は121℃、15分の蒸気加圧滅菌により作成した。3%ショ糖と植物ホルモンとして 10^{-5} M α -ナフチル酢酸を含有する表1に示すWPM培地(0.1 M水酸化ナトリウムによりpH 5.7に調整)を0.8%寒天によって固化した固体培地上に表面殺菌したクロタネソウ種子を無菌的に置床した。25℃、暗所にて1週間培養後、不定形の脱分化細胞(カルス)が誘導された。得られたカルスの一部を分離し、カルス誘導に用いた培地と同じ組成の固体培地上に置床して増殖させた。この工程を3回繰り返すことによって、安定して増殖する細胞株が得られた。

【0032】

【表1】

表1 培地組成

成分	重量濃度 mg/l
硝酸ナトリウム	1500
硫酸カリウム	495
塩化カルシウム・2H ₂ O	96
硝酸カルシウム	556
硫酸マグネシウム・7H ₂ O	370
リン酸二水素カリウム	170
EDTAナトリウム鉄	42
ホウ酸	6.2
硫酸マンガン・4H ₂ O	22.3
硫酸亜鉛・7H ₂ O	8.6
モリブデン酸Na・2H ₂ O	0.25
硫酸銅・5H ₂ O	0.25
イノシトール	100
ニコチン酸	0.5
レグリシン	2
塩酸ピリドキシン	0.5
塩酸チアミン	1
α -ナフタレン酢酸ナトリウム	2.08
ショ糖	30000

【0033】

[実施例2]

実施例1により誘導された細胞を表1の組成の液体培地に懸濁して培養した。培養条件は3l容量のフラスコに培地量300mlを加えて、25℃、暗所、細胞密度 9.6 g/l 、100回転/分の回転振とう培養及び、培養期間3週間とした。培養液にキレート剤

CyDTA (トランス-1, 2-ジアミノシクロヘキサン-N, N, N', N'-テトラ酢酸一水和物) を 25 mM となるように加えて、高速液体クロマトグラフィー (使用カラム 東ソー TSK gel G5000 P WXL) 分析して、ペクチン濃度 2.07 g/l、細胞の増殖率 42.8 倍が得られた。

【0034】

[実施例 3、4]

3 l 容量のフラスコに対して、300 ml の培地量を 500 ml 及び 800 ml として実施例 2 と同様の培養を行い、各々、ペクチンを得た。結果を表 2 に示した。

【0035】

【表 2】

表 2 ペクチンの製造結果

実施例番号	2	3	4
培地量(ml)	300	500	800
ペクチン濃度(g/l)	2.07	1.58	1.08
増殖率(倍)	42.8	29.0	28.0

【0036】

[実施例 5]

実施例 1 において誘導された細胞を表 1 の組成の液体培地に懸濁して細胞密度を高密度化した条件で培養した。培養条件は 300 ml 容量のフラスコに培地量 40 ml を加えて、25℃、暗所、細胞密度 200 g/l、100 回転/分の回転振とう培養、及び培養期間 1 週間とした。培養液を実施例 2 と同様の方法で分析して、ペクチン濃度は 1.51 g/l、細胞の増殖率 1.87 倍が得られた。

【0037】

[実施例 6～9]

実施例 5 で 40 ml の培地量を 60、80、100 ml 及び 120 ml として実施例 5 と同様の培養を行い、各々、ペクチンを得た。結果を表 3 に示した。

【0038】

【表 3】

表 3 ペクチンの製造結果

実施例番号	5	6	7	8	9
培地量(ml)	40	60	80	100	120
ペクチン濃度(g/l)	1.51	1.24	0.86	0.66	0.51
増殖率(倍)	1.87	1.80	1.53	1.30	1.27

【0039】

[実施例 10]

ニゲラ・サティバ (*Nigella sativa*) の幼苗を実施例 1 と同様の方法でカルスを誘導し、繰り返して 3 回培養することによって、安定増殖する細胞株を得た。得られた細胞を表 1 の組成の液体培地に懸濁して、実施例 7 と同様の条件で培養した。培養液を分析して、ペクチン濃度 1.60 g/l、細胞の増殖率 18.6 倍が得られた。

【0040】

[実施例 11]

実施例 3 で得られた培養液から細胞等の固形物を濾過によって除いた液 2 l (フラスコ 5 本) に 40 ml の 0.5 M エチレンジアミン四酢酸 (pH 8) を添加し、溶液中のペクチンを可溶化した後、更に微細な固形物を濾過分離した。濾過液にエタノール 6 l を加えて、緩やかに攪拌することによってペクチンを沈殿物として得た。1 日冷蔵後、沈殿物を水 1 l に再溶解して、ペクチン溶液を得た。更に溶液から濾過によって不溶性成分を除いて凍結乾燥することによって、白色粉末としてペクチン 3.2 g が得られた。

【0041】

[実施例12]

(1) 検量線の作成

ポリエチレングリコール (分子量 2×10^6 、和光純薬試薬) を 1 g/l 濃度となるように水に溶解し、以下の条件でゲル濾過クロマトグラフィーを測定した。

カラム : 東ソー製 TSK gel G5000PWL
 移動相 : 0.1 M 硝酸ナトリウム水溶液
 流速 : 0.5 ml/分
 温度 : 40°C
 試料濃度 : 1 g/l 濃度の水溶液
 試料注入量 : $10 \mu\text{l}$
 検出器 : 示差屈折計 (島津製作所製 RID-10A)

得られた分布曲線において、ピークを示す保持時間が 10.8 分であった。同様にポリエチレンオキシド (分子量 1×10^6 、 5×10^5 、 2×10^5 、ジーエルサイエンス試薬) をゲル濾過クロマトグラフィーで測定して、ピークを示す保持時間がそれぞれ、 11.3 分、 11.8 分、 13.2 分であった。分子量と保持時間の関係をプロットして、検量線を作成した。

【0042】

(2) ペクチンの分子量の測定

実施例 11 において得られたペクチンを 1 g/l 濃度となるように水に溶解し、上記の条件でゲル濾過クロマトグラフィーを測定した。得られた分布曲線は保持時間が 9.1 分～ 13.2 分の範囲にあり、且つ、ピークを示す保持時間が 10.8 分であった。検量線から、実施例 11 において得られたペクチンは分子量の範囲が $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ であり、ピークを示す分子量が 2.0×10^6 であった (図 1)。

【0043】

[試験例 1]

実施例 11 において得られた本発明のペクチンをペーパーディスク法で水分保持能を調べた。すなわち、本発明のペクチンの濃度 1 g/l の水溶液を調製し、直径 8 mm の濾紙にサンプル $10 \mu\text{l}$ を含浸させ、温度 25°C 、相対湿度 20% の条件下に置き、経時的に重量変化 (水分残存率) を測定した。対照として、水、 1 g/l 濃度のヒアルロン酸ナトリウム (和光純薬、分子量の範囲が $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ であり、分子量ピークは 1.7×10^6) 水溶液、及び、 1 g/l 濃度の市販ペクチン (柑橘由来のペクチン、東京化成、分子量の範囲が $1 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$ であり、分子量ピークは 1.0×10^5) 水溶液を用いた。結果を表 4 に示した。本発明のペクチンは対照と比較して、高い水分残存率であり、高い水分保持能を持つことがわかった。

【0044】

【表 4】

表 4 水分残存試験結果

時間 (分)	水分残存率(%)			
	水	市販ペクチン	ヒアルロン酸 ナトリウム	本発明 ペクチン
0	100.0	100.0	100.0	100.0
2.5	87.1	87.7	90.1	91.4
5	74.2	76.9	79.2	81.6
7.5	62.4	65.3	69.3	72.0
10	51.5	54.7	59.4	62.2

【0045】

[試験例 2]

実施例 11 において得られた本発明のペクチンの 1 g/1 濃度の水溶液を調製し、皮表角層水分量測定装置 SKICON-200 (アイ・ビー・エス) を用いた生体角層水負荷試験を行った。試験方法は温度 25℃、相対湿度 20% の環境において、上腕内側の皮膚上にサンプル 20 μ l を滴下、10 秒後に拭き取り、その後の皮膚角層の水分量を電気伝導度の変化によって測定した。対照として、試験例 1 で使用した、水、1 g/1 濃度のヒアルロン酸ナトリウム水溶液、1 g/1 濃度の市販ペクチン水溶液を用いた。結果を図 1 に示した。本発明のペクチンは市販のペクチン及びヒアルロン酸ナトリウムより皮膚上の水分を保持する能力が高く、特に初期水分量が高いことから皮膚浸透性、親和性に優れることがわかる。

【0046】

[試験例 3]

実施例 11 において得られた本発明のペクチンの 1 g/1 濃度の水溶液を調製し、レオメーター (REOLOGICA) を用いて、温度 35℃、応力 1 Pa での粘度を測定した。対照としてグリセリン (和光純薬)、ヒアルロン酸ナトリウム (和光純薬) の 1 g/1 濃度の水溶液を用いた。結果を表 5 に示した。本発明のペクチンはグリセリンよりも高い粘性を与えるが、ヒアルロン酸ナトリウムより粘度が低かった。これは、化粧品素材として、しっとり感や滑らか感は保ちつつ、ベタつきが少ない使用感を与えることができる。

【0047】

【表 5】

表 5 粘度測定結果

	粘度 (mPa·s)
本発明 ペクチン	11.8
ヒアルロン酸 ナトリウム	44.6
グリセリン	2.5

【0048】

[製造例 1]

実施例 11 で得られたペクチン 0.1 重量%、1, 3-ブチレングリコール 2.5 重量%、グリセロール (86%) 0.5 重量%、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 0.5 重量%、乳酸 0.05 重量%、乳酸ナトリウム 0.7 重量%、エタノール 7.0 重量%、パラオキシ安息香酸メチル 0.1 重量%、香料 0.05 重量%、精製水 88.5 重量% の処方により化粧水を調製した。

【0049】

[製造例 2]

実施例 11 で得られたペクチン 0.2 重量%、流動パラフィン 4.0 重量%、スクワラン 4.0 重量%、セタノール 0.5 重量%、ステアリン酸 1.5 重量%、モノオレイン酸ソルビタン 1.0 重量%、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン 1.0 重量%、モノステアリン酸グリセロール 0.5 重量%、パラオキシ安息香酸エチル 0.2 重量%、グリセロール (86%) 3.0 重量%、1, 3-ブチレングリコール 5.0 重量%、香料 0.05 重量%、精製水 79.05 重量% の処方により乳液を調製した。

【0050】

[製造例 3]

実施例 11 で得られたペクチン 0.5 重量%、ワセリン 8.0 重量%、ラノリン 2.0 重量%、スクワラン 20.0 重量%、セタノール 5.0 重量%、モノステアリン酸グリセロール 2.0 重量%、ポリオキシエチレンモノラウリン酸ソルビタン 2.0 重量%、パラオキシ安息香酸エチル 0.2 重量%、グリセロール (86%) 5.0 重量%、1, 3-ブチレングリコール 5.0 重量%、香料 0.1 重量%、精製水 50.2 重量% の処方により乳液を調製した。

りクリームを調製した。

【0051】

[製造例4]

実施例7で得られた培養液を実施例11と同様の方法で処理して得られたペクチン0.3重量%、ポリビニルアルコール18.0重量%、ポリエチレングリコール2.0重量%、1,3-ブチレングリコール5.0重量%、エタノール8.0重量%、パラオキシ安息香酸メチル0.1重量%、香料0.05重量%、精製水66.55重量%の処方によりパックを調製した。

【0052】

[製造例5]

実施例10で得られた培養液を実施例11と同様の方法で処理して得られたペクチン1.0重量%、1,3-ブチレングリコール20.0重量%、グリセロール(86%)15.0重量%、ポリエチレングリコール5.0重量%、ポリオキシエチレンヘキサデシルエーテル0.1重量%、クエン酸0.05重量%、クエン酸ナトリウム0.5重量%、パラオキシ安息香酸メチル0.2重量%、香料0.1重量%、精製水58.05重量%の処方によりエッセンスを調製した。

【産業上の利用可能性】

【0053】

実施例に詳述した様に、本発明によってニゲラ属植物の細胞培養によって高分子量のペクチンを提供することができる。得られた高分子量のペクチンは高い水分保持能と低い粘性を有しているため、化粧品素材、特に、保湿剤としての利用が可能となる。

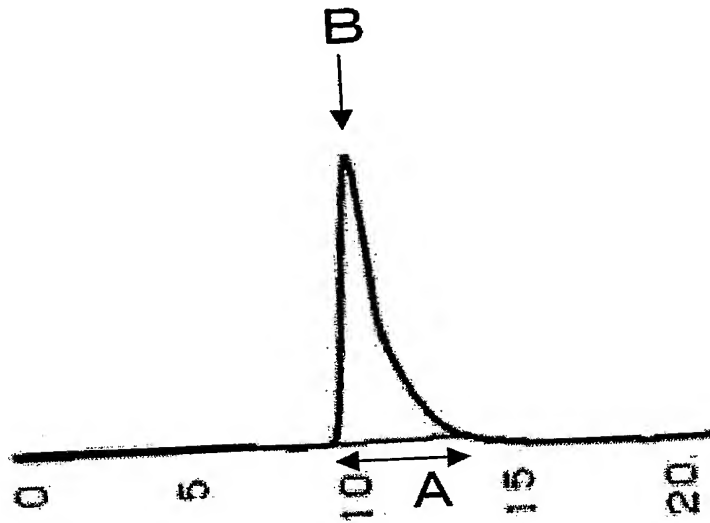
【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】「実施例12(2)の結果を示す図(グラフ)である。図中、Aは分子量の範囲、Bは分子量のピークを表す。」

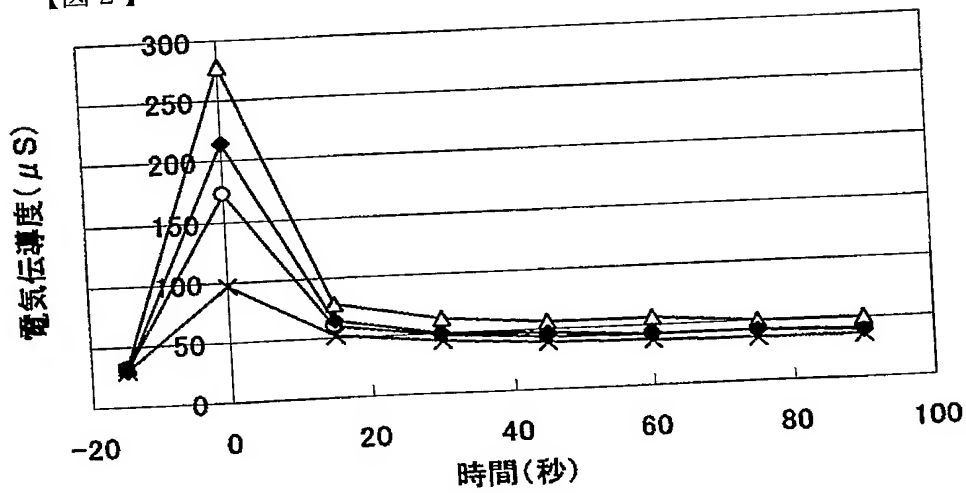
【図2】「試験例2の結果を示す図(グラフ)である。図中、△は本発明ペクチン、◆はヒアルロン酸ナトリウム、○は市販ペクチン、×は水を表す。」

【書類名】図面
【図 1】



保持時間(分)

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物からの抽出で得られているペクチンに対して、更に分子量の高いペクチンの特性を見い出し、多量に供給できる方法を提供することである。

【解決手段】 ニゲラ属植物からカルスを誘導し、更に得られたカルスを培養することにより、培養物又は培養液中に高分子量のペクチンを生産させる。培養物又は培養液から分離精製して目的のペクチンを得る。得られたペクチンは保湿剤として優れた性質を有し、化粧品素材として優れている。

【選択図】 図 2

特願 2004-087499

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2003年11月 4日
住所変更
東京都港区東新橋一丁目5番2号
三井化学株式会社